

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE

FACULTÉ DES SCIENCES

Nouveaux hétérosides cardénolides formylés
chez *Digitalis lanata* Ehrh.
étudiés par chromatographie sur papier

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne
pour l'obtention du grade de docteur ès sciences

par

Dolphe KUTTER

Chimiste diplômé

LUXEMBOURG

LANE MEDICAL LIBRARY
SAN FRANCISCO

LAUSANNE

Imp. Chs Zwahlen

1957



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153518_0227

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE

FACULTÉ DES SCIENCES

Nouveaux hétérosides cardénolides formylés
chez *Digitalis lanata* Ehrh.
étudiés par chromatographie sur papier

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne
pour l'obtention du grade de docteur ès sciences

par

Dolphe KUTTER

Chimiste diplômé

LUXEMBOURG

LAUSANNE

Imp. Chs Zwahlen

1957

UNIVERSITE DE LAUSANNE

Faculté des Sciences

Vu le rapport présenté par le jury d'examen, composé de MM. les professeurs L. Fauconnet, A. Girardet et Ch. Blanc, doyen, le Conseil de Faculté autorise l'impression de la thèse de Monsieur Rodolphe KUTTER intitulée :

NOUVEAUX HETEROSIDES CARDENOLIDES FORMYLES CHEZ
DIGITALIS LANATA EHRH. ETUDIES PAR CHROMATOGRAPHIE
SUR PAPIER.

Lausanne, le 19 novembre 1957.

Le doyen de la Faculté des Sciences :

Signé : Ch. Blanc

Le présent travail a été effectué du printemps 1955 à l'automne 1957, sous la direction de M. le professeur L. Fauconnet, dans les laboratoires de pharmacognosie de l'Université de Lausanne.

M. le professeur Fauconnet a dirigé mes recherches d'une façon judicieuse et compréhensive. Je tiens à exprimer à mon maître mes plus vifs remerciements.

Que M. le professeur A. Girardet, à qui je dois de nombreuses suggestions, soit lui-aussi assuré de ma gratitude.

D. K.

A ma famille

Chapitre premier

INTRODUCTION

=====

A) GENERALITES SUR LA CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER.

1. Historique

Les origines de la chromatographie remontent à une centaine d'années. Déjà les méthodes d'analyse capillaire de RUNGE (44), de SCHÖNBEIN (48) et de GOPPELSRÖDER (19), ainsi que la purification de pétrole brut sur de la terre à foulon de DAY (10), peuvent être considérées comme des essais empiriques du genre chromatographie. Le botaniste russe TSWETT (58) a été le premier à sortir du domaine empirique en étudiant systématiquement la séparation de pigments végétaux par adsorption différentielle sur de nombreux produits pulvérulents. C'est à ce même auteur que nous devons les premières vues théoriques sur le mécanisme de la chromatographie d'adsorption. Ses conceptions sont encore considérées comme valables de nos jours.

Pendant une vingtaine d'années, les travaux de TSWETT restèrent ignorés. Les recherches chromatographiques de DHERE (12) publiées en 1911, passèrent inaperçues. C'est aux travaux de R. KUHN, A. WINTERSTEIN et E. LEDERER (36) publiés en 1931, que nous devons l'introduction de la chromatographie dans la chimie analytique et préparative. La monographie de ZECHMEISTER et CHOLNOKY (64) donne un aperçu très complet des applications de la chromatographie réalisées pendant les dix années suivantes. Le champ d'application de la chromatographie d'adsorption se limita cependant aux substances de caractère lipophile. Cette technique ne permettait pas de séparer des acides aminés, des oses et d'autres substances hydrophiles.

MARTIN et SYNGE (38) ont alors modifié la technique chromatographique pour l'appliquer à l'analyse des acides aminés dans les hydrolysats de laine; à la suite de considérations théoriques, ils mirent au point la chromatographie de partage.

Une colonne de silicagel ne leur servit plus comme adsorbant, mais comme support d'une phase immobile, non miscible au solvant utilisé pour le développement de la colonne. Ils séparèrent ainsi les acides aminés non plus par adsorption, mais par partage entre deux phases. CONSDEN, GORDON et MARTIN (8) remplacèrent par de la cellulose les gels de silice, dont ils garnissaient leurs colonnes à chromatographie de partage, et utilisèrent cette cellulose non plus sous la forme d'un cylindre à l'intérieur d'une gaine de verre, mais sous la forme d'une feuille de papier.

2. Théorie

La chromatographie de partage sur papier repose sur la répartition des substances à séparer entre deux phases non miscibles en contact l'une avec l'autre. Pour chaque substance, cette répartition est exprimée par le coefficient de partage :

$$\frac{C_1}{C_2} = \text{constante (pour une substance et une température données)}$$

C_1 = concentration de la substance dans la phase 1.

C_2 = concentration de la substance dans la phase 2.

L'une des phases - la phase dite immobile ou stationnaire - est formée par le papier imprégné. Elle est donc discontinue, ce qui lui permet d'être traversée par la phase mobile, soit par gravité dans la technique descendante employée notamment par CONSDEN, GORDON et MARTIN, soit par capillarité dans la technique ascendante de WILLIAMS et KIRBY (62), ou dans la technique horizontale de RUTTER (45), de POTTERAT (41) et d'autres. Le passage de la phase mobile entraîne un déplacement des substances déposées sur la tache initiale avec une vitesse déterminée par le coefficient de partage. On exprime cette vitesse par le R_f (retention factor):

$$R_f = \frac{\text{parcours du centre de la tache de la substance}}{\text{parcours du front de la phase mobile}}$$

3. Techniques

Les liquides utilisés pour la chromatographie sur papier sont en général des mélanges qui se séparent en deux couches et constituent le "système solvant". Les constituants en sont choisis de façon à permettre une séparation des substances à analyser sous la forme de taches nettes et distinctes. Lorsque le système solvant est formé de deux constituants largement miscibles ou de plus de deux constituants, les proportions doivent être précisées. Les constituants sont mélangés dans une ampoule à robinet et les liquides laissés en présence assez longtemps pour qu'ils soient en équilibre de saturation. L'une des deux couches formées constitue la phase mobile, l'autre sert soit à imprégner le papier, soit à maintenir la saturation des vapeurs à l'intérieur de la cuve. L'imprégnation du papier par un solvant aqueux se fait en général en phase gazeuse saturée dans la cuve chromatographique même. Pour imprégner par un solvant peu ou pas volatil, on a recours à la pulvérisation ou à l'immersion suivie d'un essuyage entre deux feuilles de papier-filtre.

Sur une feuille de papier chromatographique on trace au crayon la ligne de départ à quelques centimètres du bord. Sur cette ligne on dépose les taches de la solution contenant les substances à séparer. Le développement a lieu dans une cuve chromatographique étanche, saturée des vapeurs de tous les constituants du système solvant. Pour la chromatographie descendante, le bord supérieur de la feuille est suspendu à une auge destinée à recevoir la phase mobile. Pour la chromatographie ascendante, le bord de la feuille portant les taches est disposé dans un cristallisateur placé au fond de la cuve. Une fois l'imprégnation terminée, on introduit par un trou du couvercle la phase mobile dans l'auge pour la chromatographie descendante; pour la chromatographie ascendante, on met le papier en contact avec la phase mobile. On développe jusqu'à ce que les constituants du mélange soient séparés en taches nettes. La feuille est alors sortie et séchée à l'air, ou à l'étuve si l'on a employé des solvants peu volatils.

4. Révélation

Si les substances ainsi séparées sont colorées ou fluorescentes, on peut en observer les taches directement à la lumière ordinaire ou sous les rayons ultra-violet. Si elles sont invisibles directement, on doit les révéler, c'est-à-dire les transformer en substances colorées ou fluorescentes en traitant les chromatogrammes par des réactifs appropriés, dits révélateurs.

B) APPLICATION AUX CARDIOTONIQUES DIGITALIQUES.

SVENDSEN et JENSEN (52) publièrent les premiers des expériences utilisant la chromatographie de partage sur papier dans l'analyse des hétérosides digitaliques. Ils ont utilisé d'abord des systèmes solvants à base de chloroforme, de méthanol et d'eau. De nombreux chercheurs ont suivi leur exemple et proposé des systèmes solvants plus ou moins perfectionnés. TUZSON et VASTAGH (59), DEQUEKER et LEMLI (11) et d'autres utilisent la chromatographie sur papier pour le contrôle des médicaments contenant des hétérosides digitaliques. Tous les auteurs qui analysent de cette façon des extraits ou macérats complets de digitale observent sur leurs chromatogrammes des taches dues à des substances inconnues (JAMINET (26), TSCHESCHE (54), JENSEN (27,28), FAUCONNET et KREIS (15,16), DASH et FRITH (9), SILBERMANN et THORP (49), notamment). Des réactions spécifiques de ces substances avec certains révélateurs leur permettent d'affirmer qu'il s'agit d'hétérosides cardiotoniques.

Les dérivés du m-dinitrobenzène donnent une réaction colorée spécifique avec le noyau buténolide (réactions de RAYMOND 42), KEDDE (35), BALJET (1), KIMURA (34), etc. L'acide trichloracétique additionné d'un oxydant réagit avec les cardiotoniques digitaliques en donnant des composés à fluorescences diverses.

Lorsqu'il s'agit d'isoler un hétéroside inconnu et d'en déterminer la structure, la chromatographie sur papier est un moyen de contrôle analytique précieux aux divers stades expérimentaux. Certains auteurs s'en servent pour identifier des produits de dégradation. De telles identifications ne jouent qu'un rôle d'orien-

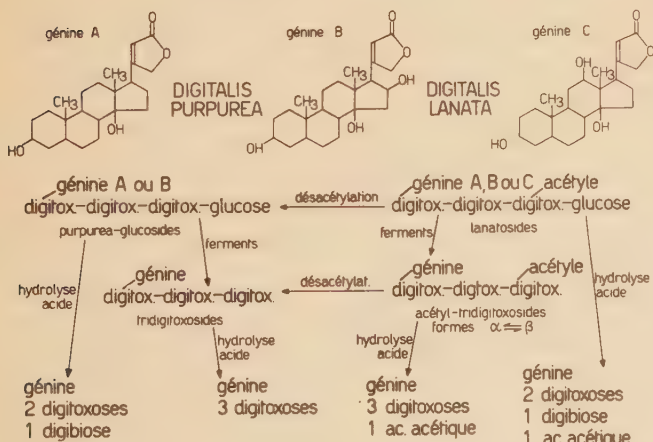
tation et sont complétées par d'autres données. Seul JENSEN (29) a publié un travail sur des substances inconnues, qu'il prépare en faible quantité par chromatographie sur papier suivie d'élu-tion, et qu'il étudie de plus près par la même technique après les avoir soumises à diverses réactions. Les conclusions de cet auteur ne mentionnent cependant aucune formule de structure pré-cise.

C'est à FAUCONNET et FAZAN (13) que nous devons de pou-voir utiliser la chromatographie sur papier à des recherches beau-coup plus poussées. Pratiquant des réactions microchimiques sur le papier même, ces auteurs ont réussi à éclaircir en partie le mécanisme de l'action du révélateur à l'acide trichloracétique de JENSEN (28) et modifié par eux-mêmes.

C) CHIMIE DES CARDIOTONIQUES DIGITALIQUES.

STOLL (51) et ses collaborateurs ont obtenu à partir de la digitale laineuse 18 substances cardiotoniques, dont ils ont établi la structure. Le tableau classique de cet auteur précise les relations entre ces substances (tableau I)

TABLEAU I



Au cours des dernières années, d'autres cardiotoniques ont été isolés à partir des digitales laineuse et pourprée. Le tableau II donne un aperçu de ces substances.

TABLEAU II

Plantes	Substance	Génine	Oses	Références bibliogr.
DP DL	Gitorine	Gitoxigénine = génine B	Glucose	(55)
DP DL	Digitalinum verum	id.	Digitalose + glucose	(25)
DP DL	Strospéside	id.	Digitalose	(63)
DP DL	Gluco-gito- fucoside	id.	Fucose + glucose	(56)
DP	Gitaloxine	Gitaloxigénine = 16-formyl-gé- nine B.	3 digitoxoses	(20)
DP	Gluco-gita- loxine	id.	3 digitoxoses + glucose	(61)
DP	Vérodoxine	id.	Digitalose	(23)
DP	Gluco-Véro- doxine	id.	Digitalose + glucose	(22)
DP	Digiproside	Digitoxigénine = génine A	Fucose	(46)
DP	Odoroside H	id.	Digitalose	(20)
DL	Diginatine	Diginatigénine	3 digitoxoses	(40)

DP= Digitalis purpurea L.

DL= Digitalis lanata Ehrh.

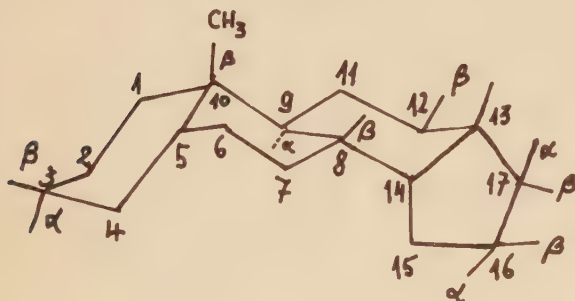
La structure de la diginatigénine de MURPHY (40), n'est pas définitivement établie. Cette génine cardénolide porte probablement des groupes OH en position 12 et 16.

A cette liste KAISER, HAACK et SPINGLER (32), viennent d'ajouter les mono- et di-digitoxosides des génines A et B et de la gitaloxigénine.

Les formules planes que nous indiquons pour les génines A, B et C (tableau I) ne précisent pas la configuration spatiale

de ces molécules. On admet aujourd'hui la configuration représentée sur la figure 1 et due à BARTON (2).

FIGURE 1.



On constate sur le modèle de la figure 1 que les divers substituants ont des orientations perpendiculaires ou parallèles au plan du cycle sur lequel ils sont fixés. On les désigne comme substituants axiaux (a) ou équatoriaux (e). La réactivité de ces substituants dépend en grande partie de cette orientation. LEDERER (37) énonce à ce sujet les règles suivantes :

a) Un substituant dans une position donnée du squelette stéroïde est thermodynamiquement plus stable sous forme équatoriale que sous forme axiale.

b) Pour des réactions ioniques d'élimination concernant des substituants sur des atomes de carbone voisins, l'élimination est plus facile quand les deux substituants sont axiaux.

c) Un substituant dans une position donnée du noyau stéroïde est moins empêché stériquement sous sa forme équatoriale que sous sa forme axiale.

Ces règles nous seront d'une grande utilité pour l'interprétation de nos expériences chromatographiques.

D) BUT DU PRESENT TRAVAIL

Nous nous sommes proposés l'étude de trois hétérosides inconnus de la digitale laineuse, que FAUCONNET et KREIS (14,15), puis FAUCONNET et FAZAN (14) ont décelés par chromatographie sur papier.

Dans cette étude, nous avons renoncé à préparer des quantités pondérables, permettant une analyse par les méthodes usuelles chez les chimistes, telles que l'analyse élémentaire, la détermination du poids moléculaire, du pouvoir rotatoire, des spectres d'absorption, etc.

Nous avons tenté d'obtenir par les seuls moyens micro-analytiques de la chromatographie sur papier un maximum de renseignements et de proposer une formule de structure hypothétique.

Nous voulions savoir d'une façon plus générale jusqu'à quel point la chromatographie sur papier permet de pousser une telle étude. Nous avons préparé par chromatographie sur papier quelques dizaines de μg des substances en question, quantités suffisantes pour permettre diverses réactions et l'analyse chromatographique des produits résultant de ces transformations. Les R_f dans divers systèmes solvants et les fluorescences avant et après révélation, nous ont fourni des renseignements importants concernant ces trois substances et leurs produits de décomposition.

Notre étude nous a conduit à esquisser, pour chacune des substances que nous avons étudiées, une formule de constitution que nous mettons en discussion. Nos propositions reposent sur des faits expérimentaux interprétés à la lumière de considérations théoriques. Seules des méthodes plus sûres, mais beaucoup plus exigeantes au point de vue expérimental, permettront de vérifier, de rejeter ou de modifier nos hypothèses.

Quelques publications récentes de travaux réalisés indépendamment des nôtres confirment déjà partiellement nos hypothèses.

Chapitre deuxième

P A R T I E T H E O R I Q U E

=====

A) TRAVAUX PRECEDENTS

Dans notre laboratoire, l'étude des digitales par chromatographie sur papier a été inaugurée par FAUCONNET et KREIS (15), (16) . Ces deux auteurs ont mis au point deux systèmes solvants capables de séparer tous les cardiotoniques digitaliques connus à ce moment-là, et cela à partir d'extraits bruts ou de teintures non purifiées. La diginitine de MURPHY (40) n'est probablement séparée de la tache initiale par aucun des deux systèmes solvants. Le premier de ces systèmes, le "DMH", composé de dichlorométhane, de méthanol et d'eau dans les proportions 11 : 4 : 5, sépare les hétérosides initiaux et les hétérosides secondaires les plus hydrophiles. Le "BMH", - benzène, méthanol, eau, dans les proportions 2 : 2 : 1 - sépare les tridigitoxosides, les acétyl-tridigitoxosides et les génines. Pour les deux systèmes la phase non miscible à l'eau sert de phase mobile. L'imprégnation se fait en phase gazeuse. On développe par la technique descendante. Pour de plus amples détails, nous renvoyons aux travaux originaux.

Le révélateur utilisé par K. KREIS (35), est une solution à 25 % d'acide trichloracétique dans le chloroforme. Avant de l'utiliser, il fait subir à cette solution un vieillissement artificiel par chauffage à la lumière. Il pulvérise ce réactif sur les chromatogrammes développés et chauffe à 100 - 105° pendant 3 minutes.

FAUCONNET et FAZAN (13) ont remplacé le vieillissement par l'addition, au moment de l'emploi, de quelques gouttes d'une solution concentrée d'hypochlorite alcalin (extrait de Javel); ce révélateur acide et oxydant est désigné par ATO. Leur révélateur AT est constitué par une solution éthanolique à 25 % d'acide trichloracétique. La technique de révélation est la même que celle du révélateur ATO. Après révélation, on observe sous les rayons ultra-violets les fluorescences suivantes : (tableau III)

TABLEAU III

Génines et Hétérosides	AT	ATO	Limite de sensibilité (en µg de lan)
A	-	orange	0,3
Bc	bleu-ciel	bleu-ciel (?)	0,1 (?)
B	bleu-ciel	bleu-blanchâtre	0,1
C	-	verdâtre	0,3

Nous avons utilisé ces deux révélateurs avec de légères modifications que nous précisons dans la partie expérimentale (page 35).

La distinction entre les fluorescences B et Bc nous a paru délicate et souvent subjective; nous y avons renoncé. Dans notre travail, nous désignons par Bc les hétérosides et génines portant une fonction ester formique en position 16.

Au cours de leurs recherches FAUCONNET et KREIS ont décelé dans les feuilles de digitale laineuse une série de substances inconnues qu'ils désignent par les lettres Bc.

B) RECHERCHES PERSONNELLES

Nous avons étudié trois substances inconnues de la digitale laineuse, X₃Bc, X₄Bc, et X₅Bc, ainsi que leurs produits de dégradation en partie inconnus.

1. La substance X₅Bc

a) Généralités

En révélant uniquement au moyen du révélateur AT des chromatogrammes d'extraits récents de feuilles de digitale laineuse, nous observons parfois une tache de fluorescence B à la hauteur du lanatoside A (lan A). Après révélation au moyen du révélateur ATO, nous observons une fluorescence jaunâtre, due à la superposition des révélateurs A et B. Cette même constatation a été faite par FAZAN (18) qui désigne par X₅Bc la tache donnant la fluorescence B (chrom.1).

DASH et FRITH (9) qui utilisent plusieurs systèmes solvants semblables aux nôtres, et révèlent par l'acide trichloracétique en solution chloroformique, constatent sur les chromatogrammes de certains extraits qu'une tache de fluorescence bleue accompagne la tache du lanatoside A. Ils supposent qu'il s'agit d'un pigment végétal. Nous pensons que cette tache est celle d' X_5Bc .

Les Rf de X_5Bc et du lanatoside A, très voisins dans plusieurs systèmes solvants, nous paraissent être le signe d'une analogie profonde entre ces deux substances.

Les extraits ayant séjourné à température ordinaire pendant quelques mois donnent des chromatogrammes où la tache X_5Bc n'apparaît jamais (chrom. 2). Cette disparition semble s'accompagner d'une augmentation de la tache du lanatoside B (lan B). Dans les extraits traités par l'acétate de Pb, cette réaction est fortement accélérée. La teneur en X_5Bc d'extraits conservés à la glacière reste cependant assez constante.

Pour prouver que X_5Bc se transforme réellement en lanatoside B, nous avons profité de la réaction avec l'acétate de Pb. Nous avons préparé une faible quantité d' X_5Bc (contenue dans 0,2 g de feuille sèche) par élution de chromatogrammes non révélés (cf. partie expérimentale p. 35). La moitié de cet éluat a été traitée par une solution aqueuse à 5 % d'acétate neutre de Pb. Sur le chromatogramme DMH de l'éluat initial, nous retrouvons la tache X_5Bc qui recouvre totalement le lanatoside A élué simultanément (chrom. 3). Sur le chromatogramme de la fraction d'éluat traitée par l'acétate de Pb, X_5Bc a disparu totalement au profit du lanatoside B, tandis que le lanatoside A est resté intact et présente, après révélation ATO, sa fluorescence orange typique (chrom. 4).

Nous avons contrôlé ce résultat au moyen du système solvant pentanol + eau 1:1 (PH), préconisé par TSCHESCHE, GRIMMER et SEEHOFER. Dans ce système, où la phase aqueuse sert de phase mobile, le lanatoside B et le produit de décomposition de X_5Bc ont même Rf et se superposent (chrom. 17).

Pour confirmer ce résultat, nous avons traité par du bicarbonate de Na l'éluat contenant X_5Bc . Il résulte des chromatogrammes DMH et PH que ce réactif décompose X_5Bc en désacétyl-lanatoside B

(déslan B) comme le lanatoside B (chrom. 5 et 18). Simultanément le lanatoside A est transformé en désacétyl-lanatoside A (déslan A).

Ainsi X₅Bc, instable en solution hydro-alcoolique, se transforme lentement et spontanément en lanatoside B, transformation que l'acétate de Pb accélère beaucoup.

b) La transformation de X₅Bc en lanatoside B.

Les Rf de X₅Bc et du lanatoside B dans le système DMH indiquent bien que X₅Bc est nettement moins hydrophile que le lanatoside B. Nous admettons que la transformation de X₅Bc en lanatoside B correspond à l'hydrolyse d'une fonction ester. Cette hypothèse explique très bien que X₅Bc soit moins hydrophile que le lanatoside B. Une telle hydrolyse libère en effet un groupe hydroxyle, ce qui implique que la substance libérée est plus hydrophile.

On observe des phénomènes semblables lors de la désacétylation des lanatosides (acétylés sur le troisième digitoxose) (chrom. 5) et des hétérosides à oléandrigénine, acétylés en 16 (chrom. 14, 15 et 16).

Nous excluons qu'un autre groupe OH soit introduit dans la molécule, une telle réaction n'ayant jamais été observée. BROWN, SHEPHEARD et WRIGHT (4) admettent bien une transformation métabolique de la digitoxigénine (gén A) dans le foie par introduction d'un groupe OH en 16, c'est-à-dire une transformation en gitoxigénine (gén B). Ils n'en donnent cependant pas de preuve suffisante et nous doutons fort de la valeur de cette hypothèse.

c) Localisation des fonctions ester.

Comme la substance X₅Bc se décompose en lanatoside B, nous pouvons admettre qu'elle possède la fonction ester acétique commune à tous les lanatosides. Cette fonction se trouve sur le troisième digitoxose.

Pour localiser la fonction ester sensible à l'acétate de Pb, nous avons dégradé X₅Bc par des hydrolyses enzymatique et acide et nous avons soumis les produits de dégradation à l'action de l'acétate de Pb.

Ces hydrolyses ont été effectuées sur du X₅Bc préparé par élution de chromatogrammes sur papier. Ces éluats contiennent aussi toujours du lanatoside A. La révélation successive par les révélateurs AT et ATO, nous permet néanmoins d'interpréter les chromatogrammes des divers hydrolysats sans être gêné par les substances A.

Pour l'hydrolyse enzymatique nous avons utilisé une préparation enzymatique selon WEGNER (60). Par chromatographie sur papier dans le système acétate d'éthyle + eau + pyridine 2 : 2 : 1 (AHPy) de JERMYN et ISHERWOOD (30) nous avons constaté que cette réaction ne libère pas d'autre ose que du glucose (provenant en partie de l'hydrolyse du lanatoside A) (chrom.44). Nous avons utilisé le révélateur au dichlorhydrate de m-phénylène-diamine de CHARGAFF, LEVINE et GREEN (7). Le chromatogramme BMH de l'extrait chloroformique de cet hydrolysats présente les taches suivantes : acétyl-gitoxine, ac-tri B (faible), une tache inconnue de fluorescence B que nous désignons par X₁₂Bc, surmontant de peu la tache de l'acétyl-digitoxine (ac-trix A), qui provient du lanatoside A. Sur le chromatogramme de l'hydrolysats traité par l'acétate de Pb la tache X₁₂Bc n'apparaît plus. Nous constatons que cette disparition correspond à une nette augmentation de la tache de l'acétyl-gitoxine (chrom. 25 et 26).

X₅Bc étant un ester du lanatoside B, l'hydrolyse enzymatique lui a enlevé un glucose, comme elle le fait aux lanatosides, et l'a transformé en X₁₂Bc, sensible lui aussi à l'acétate de Pb qui l'hydrolyse en acétyl-gitoxine. X₁₂Bc est donc un ester de l'acétyl-gitoxine. Ainsi le groupe ester sensible à l'acétate de Pb est fixé soit sur un digitoxose, soit sur la partie génine de la molécule.

Pour préciser ce dernier point, nous avons soumis X₅Bc à une hydrolyse acide modérée selon HAACK, KAISER et SPINGLER (21). Sur le chromatogramme BMH de cet hydrolysats nous observons les taches de la gitoxigénine, de la digitoxigénine (provenant du lanatoside A) et une tache B inconnue (chrom. 27). Comme cette dernière a le même R_f que la tache X₉Bc, qu'observent FAUCCONNET et FAZAN (14) dans les hydrolysats acides d'X₃Bc, nous la désignons aussi par X₉Bc. Dans l'hydrolysats traité par l'acétate de Pb, X₉Bc a disparu au profit de la gitoxigénine (chrom. 28).

X₉Bc apparaît donc comme une gitoxigénine portant encore un groupe ester sensible à l'acétate de Pb. Le groupe OH en position 16 de la gitoxigénine est seul susceptible d'être acylé, celui du carbone 14 étant tertiaire, donc non acylable, celui du carbone 3 ayant porté la chaîne des oses.

C'est donc en position 16 que sont acylés :

X₅Bc, ester du lanatoside B

X₁₂Bc, ester de l'acétyl-gitoxine

X₉Bc, ester de la gitoxigénine.

d) Nature de l'ester en 16.

Outre la fonction ester acétique propre au lanatoside B, X₅Bc possède donc une deuxième fonction ester en 16. Vu sa réaction particulière avec l'acétate de Pb, nous supposons qu'elle est de nature différente, c'est-à-dire que le groupe OH en 16 est estérifié par un acide autre que l'acide acétique.

Nous avons d'ailleurs montré par chromatographie sur papier que l'oléandroside, hétéroside à gitoxigénine acétylée en 16, que nous avons préparé à partir des comprimés "Folinérine-Schering", est stable en présence d'acétate de Pb. Cet ester est hydrolysé par le bicarbonate de Na (chrom. 14, 15 et 16).

Nous avons recueilli divers arguments en faveur d'une estérification par l'acide formique :

Lors de leurs recherches sur le "Vérodigène-Boeringer", HAACK, KAISER, GUBE et SPINGLER (23) ont découvert dans cette spécialité une gitoxigénine formylée en 16 et deux hétérosides contenant cette génine. Il s'agit de la gitaloxine (16-formyl-gitoxine) et de la vérodoxine (16-formyl-strospéside). Le comportement de ces substances correspond sur plusieurs points à celui que nous observons chez X₅Bc.

Sur un chromatogramme BMH d'un extrait de comprimés "Vérodigène", nous retrouvons ces trois substances accompagnées de leurs produits de déformylation présents en plus forte quantité (chrom. 29). La gitaloxine surmonte la digitoxine (tri A), la vérodoxine surmonte l'odoroside H et la gitaloxigénine surmonte la digitoxigénine (gén A), (cf. "Le parallélisme A-Bc" sous f).

Sur le chromatogramme d'un extrait traité par l'acétate de Pb, ces trois substances n'apparaissent plus (chrom. 30). Comme les taches des produits de déformylation sont très fortes, nous ne pouvons pas affirmer que cette disparition soit accompagnée d'une augmentation de ces dernières. Nous avons alors préparé la gitaloxine par élution de chromatogrammes sur papier d'un extrait de "Vérodigène". Après avoir traité une partie de cet éluat par l'acétate de Pb, nous chromatographions les deux parties dans le système BMH. Sur le chromatogramme de l'éluat initial nous retrouvons la gitaloxine surmontant de très près la tache de digitoxine (chrom. 40). Sur le chromatogramme de l'éluat traité par l'acétate de Pb, la gitaloxine a complètement disparu au profit de la gitoxine (tri B); (chrom.41). Nous pouvons ainsi affirmer que l'acétate de Pb a provoqué la déformylation de la gitaloxine.

Nous avons essayé de formyler de la digitoxigénine selon les indications de HAACK, KAISER et SPINGLER (21). Sur le chromatogramme BMH du produit de cette formylation nous observons deux taches de fluorescence A, celle de la digitoxigénine et une tache inconnue X₃A (R_f = 0,95) nettement moins hydrophile. Si nous traitons une portion de cette solution par l'acétate de Pb, nous constatons par chromatographie BMH que la substance X₃A a disparu au profit de la digitoxigénine. X₃A: est donc vraisemblablement la 3-formyl-digitoxigénine, le groupe OH en position 3 étant seul acylable.

Cette dernière substance réagit donc avec l'acétate de Pb comme X₅Bc et ses produits de dégradation X₁₂Bc et X₉Bc estérifiés en 16. C'est pourquoi nous admettons que X₅Bc est un ester formique du lanatoside B. Nous localisons le groupe ester formique sur l'OH en 16, (I).

Nous identifions ainsi la substance X₉Bc, qui n'est autre que la gitaloxigénine (III). X₅Bc serait alors la gluco-acétyl-gitaloxine, tandis que X₁₂Bc serait l'acétyl-gitaloxine (II). La littérature ne mentionne aucun hétéroside naturel estérifié à la fois par l'acide formique et l'acide acétique.

e) Mécanisme de l'action de l'acétate de Pb.

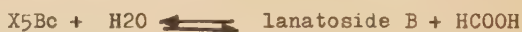
En traitant les teintures méthanoliques de digitale laineuse par des solutions aqueuses de divers sels de Ba, Ni, Na et Pb,

nous constatons par chromatographie sur papier en DMH que X₅Bc, ainsi que X₃Bc et X₄Bc ont disparu dans les seules solutions contenant un sel de Pb. La réaction de décomposition doit être due à l'ion Pb⁺⁺.

En présence d'eau, de nombreux esters sont partiellement hydrolysés et sont l'objet d'un équilibre que schématise l'équation bien connue :



Nous admettons pour X₅Bc un équilibre semblable :



Nous supposons qu'en présence d'ions Pb⁺⁺, il y a déplacement quantitatif de l'équilibre vers la droite, par soustraction de l'acide formique. Le formiate de Pb est en effet assez peu soluble dans l'eau (1 partie dans 63 parties d'eau) pour assurer une telle réaction. De plus, il est probable que la dissociation du formiate de Pb est très faible. L'acétate et le nitrate de Pb sont très solubles (1 partie dans 1'69 resp. 1,85 parties d'eau). Vu que le formiate de Pb est insoluble dans l'alcool, la présence de ce dernier ne pourra que favoriser le déplacement de l'équilibre vers la droite.

Nous avons vérifié le mécanisme de la déformylation par l'ion Pb⁺⁺ au moyen d'une réaction macrochimique: en ajoutant à une solution aqueuse d'acétate de Pb un excès de formiate d'éthyle, nous observons la formation d'un précipité cristallin blanc que nous avons identifié comme formiate de Pb. Le rendement en formiate de Pb de cette précipitation est de 72 % de la théorie. En utilisant une solution hydro-alcoolique d'acétate de Pb, le rendement obtenu est sensiblement plus élevé (92 %). La présence d'alcool favorise donc bien la précipitation du formiate de Pb et par là l'hydrolyse de l'ester formique.

Cette réaction nous paraît propre à une différenciation facile entre hétérosides formylés et hétérosides acétylés. Comme nous n'avons vérifié cette réaction qu'avec les esters cités, nous ne savons pas dans quelle mesure elle peut être généralisée à d'autres esters formiques.

La purification de teintures et de macérats de digitale en vue d'une analyse ou d'une préparation d'hétérosides formylés ne doit pas faire intervenir des sels de Pb.

f) Le "parallélisme" A-Bc.

Le fait qu'en DMH X₅Bc recouvre le lanatoside A, nous avait fait admettre d'emblée certaines analogies entre ces deux substances. Nous venons de voir quelles sont ces analogies: dans les deux molécules la chaîne osidique est la même. Le carbone 16 d'X₅Bc portant un groupe ester, les OH libres de ces deux substances sont en même nombre et dans les mêmes positions, ce qui explique les R_f voisins.

Au cours de nos travaux, nous avons observé que ce fait était général: sur les chromatogrammes DMH et BMH nous observons toujours qu'une substance Bc possède un R_f très légèrement inférieur à celui de la substance A correspondante (cf. tableau IV).

TABLEAU IV

Substance	Surmonte en	
	DMH	BMH
X ₃ Bc	désian A	
X ₄ Bc	X ₄ A (odorobioside G ?)	
X ₅ Bc	lan A	
X ₁₂ Bc		ac-tri A
X ₈ Bc		tri A
gitaloxine		tri A
X ₉ Bc (cf.p.33)		gén A
gitaloxigénine		gén A
vérodoxine		odoroside H

Nous avons essayé d'interpréter ce phénomène de la façon suivante: les substances Bc diffèrent des substances A correspondantes par la présence d'un groupe ester formique en 16. Dans nos systèmes solvants un groupe ester formique ou acétique n'a qu'une influence minime sur le R_f. Les OH libres sont en même nombre et

dans les mêmes positions dans les deux molécules, ce qui explique leurs Rf voisins. La déformylation libère un groupe OH en 16, augmente sensiblement le caractère hydrophile, et nous observons une diminution notable du Rf.

2. La substance X₄Bc.

a) Généralités.

Sur certains chromatogrammes DMH d'extraits récents de feuilles de digitale laineuse, nous observons après révélation par l'AT l'apparition d'une tache à fluorescence B au niveau du lanatoside C (lan C) (chrom.1). Nous la retrouvons toujours sur les chromatogrammes d'extraits frais de graines de la même plante (chrom. 8 et 10). Par contre, elle n'apparaît jamais sur les chromatogrammes d'extraits vieux de quelques mois ou traités par l'acétate de Pb, (chrom. 2). Ce comportement rappelle celui de X₅Bc, que nous considérons comme un ester formique en position 16.

b) La transformation de X₄Bc en digitalinum verum.

Pour caractériser X₄Bc, nous avons procédé comme lors de l'étude de X₅Bc.

Nous avons préparé quelques dizaines de µg de cette substance par élution de chromatogrammes non révélés d'extraits de feuilles. Par ce procédé, nous éluons simultanément le lanatoside C. Une partie de cet éluat a été traitée par l'acétate de Pb. Sur le chromatogramme DMH de l'éluat initial, nous observons la tache X₄Bc, dont le Rf est très peu supérieur à celui du lanatoside C (chrom. 6) Sur le chromatogramme de l'éluat traité par l'acétate de Pb, la tache X₄Bc a disparu au profit d'une tache nette de digitalinum verum (DV) (chrom. 7). Le lanatoside C est resté inaltéré. Nous avons chromatographié dans le système solvant PH cet éluat traité par l'acétate de Pb et nous avons constaté la superposition du produit de dégradation de X₄Bc avec le digitalinum verum (chrom. 19).

Nous avons répété la même expérience avec un extrait de graines de digitale laineuse contenant presque uniquement X₄Bc (chrom. 8). Là aussi, nous avons constaté que le traitement par

l'acétate de Pb provoque la décomposition de X₄Bc en digitalinum verum (chrom. 9).

En nous fondant sur les arguments que nous avons énoncés pour considérer X₅Bc comme un ester formique, nous admettons que X₄Bc possède aussi une telle fonction. X₄Bc serait un ester formique du digitalinum verum.

c) Localisation du groupe ester.

Nous avons soumis X₄Bc, préparé par élution, à une hydrolyse acide modérée selon HAACK et KAISER et SPINGLER (21). Sur un chromatogramme BMH de cet hydrolysate nous observons deux taches B; l'une correspond à la gitoxigénine, l'autre surmonte la digitoxigénine et possède le même R_f que la tache X₉Bc, que nous avons obtenue par hydrolyse acide modérée de X₅Bc (chrom. 31). Sur le chromatogramme d'une fraction d'hydrolysate traitée par l'acétate de Pb, la tache de X₉Bc a disparu au profit de celle de la gitoxigénine (chrom. 32).

Le fait que l'hydrolyse acide modérée de X₄Bc donne X₉Bc, génine formylée, permet de localiser la fonction ester formique sur le carbone 16. Nous nous fondons sur des arguments semblables à ceux que nous avons énoncés lors de l'étude de X₅Bc.

X₄Bc est donc un 16-formyl-digitalinum verum (IV).

Nous avons déjà émis cette hypothèse en 1956 (FAUCONNET et KUTTER, 17). Simultanément cette substance a été découverte dans les feuilles et les graines de *Digitalis purpurea* L. par HAACK, KAISER, GUBE et SPINGLER (22). Ils l'appellent gluco-vérodoxine. Nous reprenons cette désignation. Nous pensons être les premiers à mentionner la présence de cette substance dans les feuilles et les graines de *Digitalis lanata* Ehrh.

SILBERMAN et THORP (49) ainsi que DASH et FRITH (9) signalent sur leurs chromatogrammes d'extraits bruts de feuilles de digitale laineuse une tache inconnue située entre le lanatoside B et le lanatoside C. Ils ne spécifient pas la fluorescence de cette tache, qu'ils trouvent aussi sur les chromatogrammes d'un mélange de lanatosides bruts préparés selon les indications de STOLL (51).

Bien que leur système solvant soit différent du nôtre, nous pensons que cette tache peut correspondre à la gluco-vérodoxine.

La présence de la gluco-vérodoxine dans les feuilles de digitale laineuse explique peut-être que du digitalinum verum ait été décelé dans certains lots de lanatoside C "Sandoz" (K.KREIS 35, TUSZON et VASTAGH 59). D'après les résultats chromatographiques, la gluco-vérodoxine et le lanatoside C semblent avoir des coefficients de partage très voisins et sont probablement difficiles à séparer. Le digitalinum verum se formerait par déformylation spontanée de la gluco-vérodoxine.

d) Contenu hétérosidique des graines de Digitalis lanata Ehrh.

Outre la gluco-vérodoxine et son produit de déformylation le digitalinum verum, les graines de digitale laineuse contiennent du désacetyl-lanatoside A et trois autres hétérosides à digitoxigénine, X₁A, X₂A et X₄A. Les substances X₃Bc et X₁Bc s'y rencontrent en quantité plus faible (chrom. 10). Nous ne constatons que très rarement la présence de lanatoside A dans les extraits de graines. Les lanatosides B et C n'apparaissent pas sur nos chromatogrammes.

La substance X₄A se trouve dans les graines d'une façon assez régulière. Nous ne la trouvons que très rarement dans les extraits de feuilles. Vu le parallélisme A-Bc que nous signalons à la page 17, nous pensons qu'il s'agit d'un gluco-digitaloside A, probablement de l'odorobioside G, que ROSSELET et REICHSTEIN (43) ont isolé de l'écorce de Nerium odorum. HAACK et coll. (22) supposent que cette substance est présente dans les graines de Digitalis purpurea.

Il est intéressant de constater que chez Digitalis Lanata les graines ne contiennent pas tous les nombreux hétérosides qu'on trouve dans la feuille. De ce fait les graines de Digitalis lanata diffèrent peu par leur contenu hétérosidique de celles de Digitalis purpurea, alors que les feuilles des deux espèces diffèrent beaucoup.

3. La substance X₃Bc.

a) Travaux précédents.

K. KREIS (35) a constaté le premier que X₃Bc se rencontre

le plus souvent en quantité appréciable dans les extraits récents de feuilles de digitale laineuse. FAUCONNET et FAZAN (14) ont entrepris une étude plus approfondie de cette substance. Ils ont observé que cette substance a sur les chromatogrammes DMH un Rf légèrement inférieur à celui du désacétyl-lanatoside A. Dissoute, la substance se décompose lentement. Sur les chromatogrammes DMH d'extraits vieux de quelques mois, la tache correspondante n'apparaît plus. La tache du désacétyl-lanatoside B paraît alors renforcée. Utilisant le système PH, ils ont cependant constaté que le produit de dégradation de X₃Bc est plus hydrophile que le désacétyl-lanatoside B. Ils l'ont désigné par X₁B. La transformation de X₃Bc en X₁B est rapide en présence de bicarbonate de Na et d'acétate de Pb.

Par chromatographie de partage sur colonne de cellulose FAZAN (18) a séparé des fractions contenant surtout X₃Bc, mais aussi du désan A et des substances non cardiotoniques. L'hydrolyse enzymatique de ce X₃Bc impur libère du glucose, de la gitoxine et un hétéroside plus lipophile X₈Bc, probablement un tridigitoxoside Bc. L'hydrolyse acide modérée libère du digitoxose et du digilanidobiose, ainsi que de la gitoxigénine et une substance B plus lipophile X₉Bc. A la suite de comparaisons, l'auteur supposait que X₉Bc était identique à l'oléandrigénine. Il admettait en outre que X₃Bc était un ester acétique d'une substance proche du désacétyl-lanatoside B, sans pouvoir expliquer, ni la différence entre X₁B et le désacétyl-lanatoside B, ni la décomposition de X₃Bc en X₁B sous l'effet de l'acétate de Pb.

Nous avons repris l'étude de la substance X₃Bc dès le début.

b) Généralités.

Nous observons la substance X₃Bc sur les chromatogrammes DMH de teintures ou d'extraits aqueux récents de feuilles de digitale laineuse. Elle y donne une tache recouvrant partiellement celle du désacétyl-lanatoside A (chrom. 1). Même si nous prolongeons le développement jusqu'à 48 heures, nous ne pouvons pas séparer complètement ces deux substances. Nous en déduisons qu'elles présentent probablement certaines analogies.

Sur les chromatogrammes traités par le révélateur AT, la tache X₃Bc a sous les rayons UV une fluorescence bleu-ciel, sembla-

ble à celle que nous observons pour les hétérosides de la série B. Par une technique semblable à celle qu'ont décrite FAUCONNET et FAZAN (13), nous avons contrôlé que cette fluorescence est due à la formation de 14-15,16-17-dianhydrogénine B. Nous posons dans le coin d'une feuille de papier chromatographique une tache de 20 μ l d'une teinture méthanolique de feuille de digitale laineuse à 10 %, et nous développons en DMH. Nous révélons par le révélateur AT uniquement la partie du chromatogramme portant les taches. Tous les hétérosides à génine B ou Bc deviennent alors visibles sous les rayons UV, où nous observons une fluorescence bleu-ciel typique pour tous. Nous développons ensuite perpendiculairement dans le système BMH et nous observons le chromatogramme sous les rayons UV sans révéler à nouveau. En face de chaque substance B, nous trouvons une tache à autofluorescence bleu-ciel, localisée près du front. Cette tache apparaît en face de X₃Bc. FAUCONNET et FAZAN (13) ont démontré qu'il s'agit de la 14-15, 16-17-dianhydrogénine B. Une réaction de RAYMOND (42) positive, que nous avons obtenue avec un éluat de ce produit de dégradation de X₃Bc confirme cette hypothèse. Selon BELLET (3) cette réaction constitue une preuve pour la présence d'un groupe hydroxyle en position 16. La substance X₃Bc possède donc une génine cardénolide portant un groupe OH en 16.

La tache X₃Bc n'apparaît plus sur les chromatogrammes de teintures ayant séjourné à température ordinaire pendant quelques semaines (chrom. 2). Cette disparition s'accompagne d'une nette augmentation d'une tache inconnue, qui acquiert une fluorescence B si on la traite par le révélateur AT. Nous la désignons par X₁B, comme l'ont fait FAUCONNET et FAZAN (14). Le R_f nettement inférieur de cette dernière substance indique une forte augmentation du caractère hydrophile.

La transformation de X₃Bc en X₁B est fortement accélérée en présence de bicarbonate de Na ou d'acétate de Pb.

Pour prouver que X₁B se forme réellement à partir de X₃Bc, nous avons préparé une faible quantité de cette dernière substance par élution de chromatogrammes sur papier. Une partie de cet éluat a été traitée par l'acétate de Pb. Sur le chromatogramme DMH de l'éluat initial, nous observons une tache X₃Bc surmontant une faible tache de désacétyl-lanatoside A (chrom. 11). Sur le chromatogramme de

l'éluat traité par l'acétate de Pb. X₃Bc a disparu au profit de X₁B, tandis que le désacétyl-*lanatoside* A est resté inaltéré (chrom.12). En DMH, X₁B se superpose au désacétyl-*lanatoside* B, même après un développement prolongé (chrom.13). Seul le système solvant PH nous permet de voir que X₁B est plus hydrophile que le désacétyl-*lanatoside* B (chrom. 20 et 21).

Après transformation de X₃Bc en X₁B, nous ne pouvons déceler aucun ose libéré lors de cette réaction.

c) La transformation de X₃Bc en X₁B.

L'hypothèse de FAUCONNET et FAZAN (14), selon laquelle cette réaction correspond à l'hydrolyse d'une fonction ester, nous paraît justifiée. Nous avons émis des hypothèses identiques pour la dégradation par l'acétate de Pb des substances X₄Bc et X₅Bc.

A la suite de nos travaux sur les substances X₄Bc et X₅Bc, nous admettons que X₃Bc possède une fonction ester formique. La réaction de cette substance avec l'acétate de Pb est en effet semblable à celle que nous avons observée pour tous les hétérosides portant une telle fonction.

d) Localisation du groupe ester.

Nous avons dégradé X₃Bc par des hydrolyses enzymatique et acide modérée et nous avons soumis les produits de dégradation à l'action de l'acétate de Pb.

Toutes ces hydrolyses ont été effectuées sur du X₃Bc préparé par élution de chromatogrammes sur papier.

Pour l'hydrolyse enzymatique nous avons utilisé une préparation enzymatique selon WEGNER (60). Par chromatographie dans le système AHPy déjà cité p. 13, nous avons constaté que cette réaction libère du glucose (chrom. 44). Chromatographié dans le système BMH, cet hydrolysate montre une tache inconnue de fluorescence B, que nous désignons par X₈Bc (chrom.42). Elle surmonte de près une tache de digitoxine (tri A), provenant du désacétyl-*lanatoside* A, mélangé à X₃Bc dans tous nos éluats. Sur un chromatogramme parallèle d'une partie d'hydrolysate traitée par l'acétate de Pb, nous n'observons plus cette tache; elle a disparu au profit d'une tache plus hydrophile qui se superpose à la gitoxine (chrom. 43). La substance X₈Bc possède donc

encore le groupe ester formique. Ainsi dans X₃Bc ce groupe ester ne peut pas être situé sur le glucose terminal.

Nous reviendrons plus loin à la substance X₈Bc et à son produit de déformylation.

L'hydrolyse acide modérée a été effectuée selon les indications de HAACK, KAISER et SPINGLER (21). Par chromatographie sur papier au moyen du système solvant AHPy, nous avons trouvé dans cet hydrolysats du digitoxose et du digilanidobiose (chrom. 46), ce qui indique que X₃Bc porte une chaîne osidique semblable à celle des désacétyl-lanatosides. Sur les chromatogrammes obtenus dans le système BMH, nous observons deux taches B, l'une se superposant à celle de la gitoxigénine (génine B), l'autre surmontant la digitoxigénine (chrom. 33). Cette dernière correspond à la tache X₉Bc de FAUCONNET et FAZAN, que nous avons observée aussi sur les chromatogrammes d'hydrolysats acides de X₄Bc et de X₅Bc. Sur le chromatogramme d'une fraction d'hydrolysats traitée par l'acétate de Pb, X₉Bc a disparu au profit d'une tache qui se superpose à celle de la gitoxigénine (chrom. 34).

Par hydrolyse acide modérée, nous obtenons bien une génine hydrolysable par l'acétate de Pb, portant donc encore un groupe ester sensible à ce réactif. Pour les raisons que nous avons déjà exposées, la position 16 entre seule en ligne de compte.

X₃Bc est donc un ester formique en 16 de X₁B.

Comme X₃Bc contient les mêmes oses que les désacétyl-lanatosides, nous pouvons admettre que la substance X₈Bc obtenue par hydrolyse enzymatique est un ester formique en 16 d'un tridigitoxoside se superposant au tri B en BMH, comme X₁B se superpose au désacétyl-lanatoside B en DMH. Nous n'avons pas trouvé de système solvant capable de séparer ces deux tridigitoxosides, alors que nous avons pu séparer X₁B et le désacétyl-lanatoside B dans le système PH. Nous reviendrons à ce sujet dans le paragraphe consacré à la substance X₁B.

Jusqu'à ce point nos résultats ne diffèrent guère de ceux obtenus par FAUCONNET et FAZAN (14). Nous avons élucidé la réaction de X₃Bc avec l'acétate de Pb, mais nous ne connaissons pas encore la différence entre X₁B et le désacétyl-lanatoside B.

e) X₃Bc et gluco-gitaloxine.

K. KREIS (35) et FAZAN (18) ont observé sur leurs chromatogrammes DMH de Digitalis purpurea une tache Bc de même R_f que X₃Bc des chromatogrammes DMH de Digitalis lanata; ils l'ont désignée aussi par X₃Bc.

A la suite des travaux de HAACK, KAISER, GUBE et SPINGLER (23) nous nous sommes demandé si la gitaloxine dérivait d'un hétéroside initial par perte d'un glucose et si cet hétéroside était X₃Bc. Entre temps WICHTL (61) observe sur ses chromatogrammes d'extraits de digitale pourprée une telle substance, qu'il appelle gluco-gitaloxine. Les chercheurs allemands (22) confirment ce résultat peu de temps après. Ils prouvent que la gluco-gitaloxine est un 16-formyl-désacétyl-lanatoside B. Comme notre X₃Bc de Digitalis lanata est un ester formique en 16 de X₁B et non du désacétyl-lanatoside B, il ne peut pas être identique à la gluco-gitaloxine.

Nous avons vérifié cette différence en préparant de la gluco-gitaloxine à partir d'une teinture de digitale pourprée selon la technique habituelle. Après traitement par l'acétate de Pb, nous avons chromatographié une portion de cet éluat dans le système PH. Nous avons constaté que cette gluco-gitaloxine s'était transformée en désacétyl-lanatoside B et non en X₁B (chrom. 22, 23 et 24). Nous en déduisons que X₃Bc observé par K. KREIS (35) et FAZAN (18) dans la digitale pourprée est bien la gluco-gitaloxine et que cette substance diffère de X₃Bc de la digitale laineuse malgré l'identité des R_f en DMH.

Le problème de la différence entre X₁B et le désacétyl-lanatoside B reste donc entier.

4. La substance X₁B.

a) Généralités.

Comme nous l'avons déjà indiqué dans le paragraphe précédent (cf. page 23) la substance X₁B est distincte du désacétyl-lanatoside B. Son R_f dans le système solvant PH est intermédiaire entre les R_f du lanatoside C et du désacétyl-lanatoside C (chrom. 20) ce qui in-

dique un caractère nettement plus hydrophile que celui du désacétyl-lanatoside B. Nous avons essayé de saisir cette différence en soumettant X_1B à diverses hydrolyses. Nous avons utilisé du X_1B élué par la technique habituelle (cf. partie expérimentale p. 35).

b) Hydrolyse enzymatique.

Comme précédemment, nous avons utilisé une préparation enzymatique selon WEGNER (60). Cette réaction libère du glucose, que nous avons identifié dans le système AHPy. Il y a en outre formation d'un hétéroside secondaire qui se superpose à la gitoxine sur les chromatogrammes BMH (chrom. 39). Nous avons observé cette même superposition sur les chromatogrammes obtenus au moyen du système octanol + pentanol + formamide + eau de TSCHESCHE, GRIMMER et SEEHOFER (54), où la phase aqueuse est mobile. Vu la différence entre X_1B et le désacétyl-lanatoside B, il serait cependant difficile de concevoir la formation d'une même substance secondaire par scission d'un glucose.

X_1B et le désacétyl-lanatoside B pourraient différer par le mode de liaison des oses, le glucose terminal que libère l'hydrolyse enzymatique étant par exemple fixé une fois sur le carbone 3 du digitoxose, l'autre fois sur le carbone 4 du même digitoxose. Cette possibilité est exclue par le fait que l'hydrolyse acide libère le même digilanolobiose (digitoxose-glucose) aussi bien à partir du désacétyl-lanatoside B que de X_1B . Si le glucose libéré par hydrolyse enzymatique était fixé sur un autre carbone du troisième digitoxose, le biose que libère l'hydrolyse acide serait différent. Or nous n'avons observé aucune différence.

Nous désignons par tridigitoxoside B' (tri B') le nouvel hétéroside secondaire provenant de l'hydrolyse enzymatique de X_1B .

c) Hydrolyse acide modérée.

L'hydrolyse acide modérée de X_1B libère du digitoxose et du digilanolobiose (chrom. 47). Une hydrolyse identique du désacétyl-lanatoside B libère les mêmes oses (cf. STOLL 51). Sur les chromatogrammes BMH de cet hydrolysate nous observons une tache B, qui se superpose à celle de la gitoxigénine. Nous la désignons par génine B' (chrom. 38). Comme cette hydrolyse nous donne à partir de X_1B et du

désacétyl-lanatoside B les mêmes oses, nous supposons que la gitoxigénine diffère de la génine B', bien qu'aucun système solvant ne nous ait permis de séparer ces deux génines. Nous avons cherché à réaliser cette séparation au moyen des systèmes solvants octanol + pentanol + formamide + eau (TSCHESCHE et coll. 54) et dichlorométhane + benzène (chromatographie d'adsorption préconisée par K. KREIS, 35). Nous avons en outre essayé sans plus de succès, d'appliquer à notre système solvant BMH la technique du développement répété préconisée par KAISER (31).

d) Hydrolyse acide énergique.

Nous avons traité X₁B et le désacétyl-lanatoside B par l'acide sulfurique dans des conditions plus énergiques (cf. partie expérimentale, p. 37), ne libérant pas seulement les oses, mais agissant aussi sur les génines. Les deux substances réagissent différemment à ce traitement. En comparant les deux chromatogrammes BMH des hydrolysats, nous observons la formation de produits différents (cf. tableau V).

TABLEAU V (cf. chrom. 35 et 36)

Hydrolysats énerg. de	Taches autofluorescentes	Taches révélées par	
		AT	ATO
X ₁ B	14-15,16-17-dianhydro-génine B	gén B'	V ₁ + V ₂
déslan B	14-15,16-17-dianhydro-génine B	gén B	V ₂

À côté des génines intactes, il apparaît dans les deux cas de la 14-15,16-17-dianhydro-génine B, ainsi qu'une substance V₂ de fluorescence jaunâtre après révélation par l'ATO. À partir de X₁B, nous obtenons en outre une substance V₁, qui présente après révélation par l'ATO une fluorescence blanc-verdâtre. Son R_f est légèrement inférieur à celui de la digitoxigénine. Dans des conditions énergiques identiques, nous obtenons cette substance V₁ à partir de X₃Bc et de tous ses produits de dégradation. Nous ne l'avons jamais observée

dans les hydrolysats des substances B, telles que le désacétyl-lanatoside B, le digitalinum verum, la gluco-vérodexine et la gluco-gitaloxine.

e) La substance V₁.

Nous avons pu faire sur cette substance les expériences et observations suivantes.

Une réaction de RAYMOND positive obtenue avec un éluat de V₁ prouve que la substance possède un noyau buténolide.

Le R_f intermédiaire entre celui de la 14-15,16-17-dianhydrogénine B et celui de la génine B', nous fait supposer qu'il s'agit d'une monoanhydrogénine B'. Ce R_f est le même que celui de la monoanhydrogénine C, que nous préparons en traitant de la génine C par l'AT sur la tache initiale (chrom. 37).

La tache V₁ ne peut pas provenir d'une éventuelle impureté C (désacétyl-lanatoside C) du X₁B que nous utilisons pour nos expériences. Le désacétyl-lanatoside C soumis à la même hydrolyse énergétique que X₁B ne libère effectivement que de la génine C. Il faut des conditions plus énergiques pour arriver au stade de la monoanhydrogénine C.

f) La substance V₂

Nous avons pu prouver par une réaction de RAYMOND (42) que cette substance possède un noyau buténolide. Nous supposons qu'il s'agit d'une 8-14,16-17-dianhydrogénine B. Selon les travaux de SMITH (50) et CARDWELL et SMITH (6) sur les monoanhydrogénines A et C, l'OH en 14 de ces deux génines s'élimine avec introduction d'une double liaison en 14-15 ou en 8-14. Suivant les conditions, l'un ou l'autre isomère se forme en quantité prédominante. Il est logique d'admettre une telle possibilité pour les génines B et B'. FAZAN (18) a émis cette même hypothèse. Selon lui, la substance V₂ se forme aussi lors de la réaction des hétérosides B avec le révélateur AT. Elle ne devient visible grâce à sa fluorescence jaunâtre qu'après révélation par l'ATO. Après révélation d'un hétéroside B par l'AT, on n'observe donc que la fluorescence bleu-ciel de la 14-15,16-17-dianhydrogénine B. Après révélation par l'ATO la fluorescence de V₂ s'y ajoute. Les taches B présentent alors sous les rayons UV une fluorescence blanchâtre et non plus bleue.

g) Interprétations et discussion.

En passant en revue les résultats expérimentaux acquis jusqu'ici, nous constatons que deux faits sont susceptibles de nous renseigner sur la structure de X_1B et sur la différence avec le désacétyl-lanatoside B: le Rf de X_1B en PH et l'apparition de la substance V_1 lors du traitement acide dans la seule série de X_3Bc .

Dans le système PH le Rf de X_1B est très proche de celui du désacétyl-lanatoside C. On sait que ce dernier possède un OH équatorial en position 12, tandis que le désacétyl-lanatoside B possède un OH axial en position 16. Nous supposons que la différence entre X_1B et le désacétyl-lanatoside B réside dans l'épimérie d'un groupe OH, qui serait équatorial pour X_1B et axial pour le désacétyl-lanatoside B. Selon SAVARD (travail inédit cité par LEDERER 37) un stéroïde portant un OH équatorial est plus hydrophile que l'épimère axial correspondant. Ces considérations sont confirmées par un travail de BUSH et TAYLOR (5) qui comparent les Rf de diverses génines dans un système solvant proche de notre BMH (tableau VI, page suivante).

Dans le système PH, les faibles différences entre les Rf des lanatosides et des désacétyl-lanatosides correspondants indiquent que dans ce système l'effet des OH de la chaîne osidique sur le Rf est faible. Comme X_1B et le désacétyl-lanatoside B renferment les mêmes oses, nous supposons que l'épimérie concerne un groupe OH de la génine.

Pour expliquer que seuls X_3Bc et ses produits de décomposition donnent naissance à la substance V_1 par notre traitement acide énergique, nous supposons la même épimérie. D'après les indications de LEDERER (37) citées plus haut, un substituant équatorial est plus stable que le substituant axial correspondant. Il est donc possible qu'une génine B', possédant un OH équatorial au lieu d'un OH axial, soit plus stable que la génine B et que le traitement acide transforme cette génine B' et ses hétérosides au moins partiellement en mono-anhydrogénine. V_1 serait cette monoanhydrogénine.

TABEAU VI

Génines	OH (e)	Positions	OH (a)	Positions	Rf
Génine C	2	12, 14	1	3	0,07
Sarmento- génine	2	11, 14	1	3	0,10
Génine B	1	14	2	3, 16	0,26
Periplo- génine	1	14	2	3, 5	0,43

Où peut-être localisée l'épimérie supposée ?

Une orientation α de l'OH en position 14 est à exclure, car elle entraînerait un changement important dans la forme de la molécule stéroïde. D'après HEUSNER (24), la liaison des noyaux C et D serait trans et non plus cis. Au lieu de la forme de l'iso-étiocholane, nous aurions la forme du cholestane. Le parallélisme de X₃Bc et de ses produits de dégradation avec le désacétyl-lanatoside A et ses produits de dégradation correspondants ne serait plus expliqué. Il ne reste donc plus que le carbone 16 comme lieu possible de l'épimérie. V₁ serait une monoanhydrogénine B' privée de son OH en 14 et portant en 16 un OH α équatorial qui résiste au traitement acide.

Dans V₁ la double liaison peut s'être introduite en 8-14 ou en 14-15. Dans ce dernier cas une transformation au moins partielle en 14-15,16-17-dianhydrogénine B autofluorescente (c'est-à-dire une révélation par l'AT) devrait être possible, malgré le fait qu'il s'agit d'une élimination-cis. On obtient en effet une forte proportion de 14-15,16-17-dianhydrogénine B à partir de la génine B'. La double liaison de V₁ s'est donc probablement introduite en 8-14 (XIII). Voici le mécanisme de réaction qui nous paraît possible: Comme pour les génines A et C, le traitement acide élimine le groupe OH en position 14 avec introduction d'une double liaison tantôt en 8-14, tantôt en 14-15. La 8-14-monoanhydrogénine B' ne réagit pas plus loin, à cau-

se de la stabilité de l'OH équatorial en 16. La stabilité de cet OH dans la 14-15-monoanhydrogénine B' est probablement compromise par le voisinage de la double liaison en 14-15, renforçant l'influence des doubles liaisons du noyau buténolide. Les conditions sont dans ce cas suffisantes pour dégrader la molécule en 14-15,16-17-dianhydrogénine B, (XIV).

La structure que nous attribuons à V₁ correspond à celle que CARDWELL et SMITH (6) admettent pour l'adynérigénine. Ne disposant pas de cette substance, nous n'avons pas pu faire des vérifications.

La formule de l'adynérigénine indiquée par CARDWELL et SMITH est contestée par TSCHSCHE et SNATZKE (57) qui donnent à cette substance la forme d'un 7-8-déhydrogénine A. Selon FAUCCONNET et FAZAN (13), l'adynérigénine traitée par l'AT se transforme en anhydroadynérigénine, substance à fluorescence jaune-orange sous les rayons UV. La question de la structure de l'adynérigénine reste ouverte.

h) Conclusion.

Nous avons constaté que X₁B diffère du désacétyl-lanatoside B par ses propriétés chromatographiques dans le système PH et par un produit de dégradation V₁ obtenu par notre traitement acide énergétique. Ce produit n'apparaît pas lorsque des substances connues de la série B sont traitées de la même façon.

Pour expliquer la différence des R_f de X₁B et du désacétyl-lanatoside B, nous supposons que X₁B (VII) est un gluco-tridigitoxoside d'une nouvelle génine B', différente de la génine B par l'orientation α du groupe hydroxyle en position 16 (XI).

Le tridigitoxoside B' est le tridigitoxoside de cette même génine. X₃Bc (VII) et X₈Bc (VIII) sont les esters formylés correspondants. Ces deux substances diffèrent donc de la gluco-gitaloxine de WICHTL (61) et de la gitaloxine de HAACK et coll. (20 et 21) par l'orientation α de l'OH en position 16.

La substance X₉Bc (XI) que nous obtenons à partir de X₃Bc, diffère en ce même point du X₉Bc (III) que nous obtenons par hydrolyse de X₄Bc et de X₅Bc.

Actuellement, la littérature ne mentionne pas l'existence d'une telle génine. Après de nombreux travaux contradictoires, on admet aujourd'hui avec MOORE (39) que la génine B possède un OH 16 β . Ces contradictions pourraient peut-être s'expliquer par l'existence de deux génines épimères dans la digitale laineuse, où X₃Bc se trouve en forte proportion.

Chapitre troisième

PARTIE EXPERIMENTALE

=====

A) PAPIER CHROMATOGRAPHIQUE.

Nous utilisons exclusivement le papier Schleicher & Schuell 2045 a M sans traitement préalable.

B) REACTIFS.

Comme solvants, nous avons utilisé directement les produits "purum" du commerce. Seul le méthanol est redistillé sur KOH ou sur de l'acide oxalique.

L'acide trichloracétique, l'acide m-dinitrobenzoïque et le dichlorhydrate de m-phénylène-diamine sont des produits "purum" du commerce suisse.

c) TECHNIQUE CHROMATOGRAPHIQUE SUR PAPIER.

1. Systèmes solvants DMH, BMH et AHPy. (cf. pages 9 et 14)

Sur des feuilles de papier chromatographiques de 29 X 48 cm, nous traçons une ligne de départ à 8 cm du bord supérieur et nous y posons les taches des solutions à analyser. La distance entre les centres des taches est de 2 cm; le diamètre des taches ne doit pas dépasser 1 cm. La feuille est ensuite suspendue dans une cuve étanche saturée des vapeurs des deux phases. L'étanchéité est assurée au moyen de glycérolé d'amidon (Unguentum Glycerini Ph. H. V.). Après une imprégnation de 72 heures, à 22°-23°, nous développons par la technique descendante au moyen de la phase lipophile. La durée de développement est de 6-7 heures pour le DMH, de 8-10 heures pour le BMH et l'AHPy.

Les feuilles développées sont séchées à l'air et révélées.

2. Système solvant PH (cf. page 12.)

Dans ce système solvant c'est la phase organique, cad. le pentanol saturé d'eau, qui forme avec la cellulose la phase immobile.

La faible volatilité du pentanol empêche d'imprégner en phase vapeur saturante. Nous utilisons des feuilles de 12 x 30 cm. Après avoir posé les taches de la façon habituelle, nous imprégnons le papier par pulvérisation de la phase organique. Nous suspendons ensuite les feuilles dans une petite cuve saturée de pentanol et d'eau. Nous laissons équilibrer pendant une nuit avant de développer par la phase aqueuse. Le développement descendant dure 8 à 10 heures.

Nous séchons les feuilles à 80° environ, dans une étuve entrouverte, dans laquelle nous dirigeons un courant d'air chaud.

D) REVELATEURS.

Nous utilisons les révélateurs AT et ATO déjà mentionnés dans la partie générale (page 10). Nous avons modifié le dernier en utilisant comme JENSEN (27) une solution à 25 % d'acide trichloracétique dans l'éthanol à 95 % vol. Cette solution est beaucoup plus stable que la solution chloroformique. Au moment de l'emploi, nous ajoutons à 10 ml de cette solution 4 gouttes d'hypochlorite de Na (extrait de Javel). Après chauffage à 100-105° C pendant 3 minutes, nous obtenons les mêmes fluorescences qu'avec le révélateur ATO de FAUCONNET et FAZAN (13, 14) (cf. tableau III, page 10).

Nous révélons les oses par une solution 0,2 ml de dichlorhydrate de m-phénylène-diamine dans l'éthanol à 75 % vol. Nous pulvérisons ce réactif sur la feuille chromatographique développée et nous chauffons à l'étuve à 100° C pendant 3 minutes.

E) ELUTION PREPARATIVE.

Nous procédons comme pour un chromatogramme ordinaire. Les taches peuvent être plus rapprochées et plus chargées. Après le développement nous découpons les bords latéraux et nous les révélons. Ces bandes nous servent à localiser les diverses substances sur la partie non révélée. Dans cette dernière, nous découpons les bandes correspondant aux substances que nous voulons isoler et nous les éluons par un mélange de dichlorométhane et d'éthanol (2 : 1). Nous évaporons et nous reprenons par un solvant approprié.

Nous évaporons les éluats de substances Bc à froid, par passage d'un courant d'air.

F) HYDROLYSE PAR L'ACETATE DE PLOMB.

A 1 volume de solution méthanolique ou aqueuse de l'extrait, de l'éluat ou de l'hydrolysate à examiner, nous ajoutons 1 volume d'une solution aqueuse à 5 % d'acétate neutre de Pb. Après 24 heures, nous chromatographions dans le système solvant choisi, sans éliminer l'acétate de Pb, qui ne gêne pas la chromatographie.

G) HYDROLYSE PAR LE BICARBONATE DE SODIUM.

Nous procédons comme précédemment en ajoutant à 1 volume de solution à examiner 1 volume de solution aqueuse à 0,5 % de NaHCO_3 . Cette hydrolyse est plus lente. Nous chromatographions après une semaine de séjour à la température ordinaire.

H) HYDROLYSE ENZYMATIQUE.

Un éluat préparatif contenant environ 100 μg de substance est évaporé à sec et repris par 1 ml d'eau. Nous y ajoutons 0,1 g de préparation enzymatique obtenue selon WEGNER (60): des feuilles fraîches de digitale laineuse sont séchées à 40° C et pulvérisées; 2 g de cette poudre sont épuisés par 5 agitations successives d'une demi-heure avec chaque fois 100 ml d'eau; le résidu final est centrifugé et séché à 40° C. A la température ordinaire la durée de l'hydrolyse enzymatique est de 4-5 jours. Après filtration, nous extrayons par 3 fois 5 ml de chloroforme. Les extraits chloroformiques sont réunis et évaporés à sec (à froid s'il s'agit d'une substance Bc !). Le résidu d'évaporation est repris par 1 ml de méthanol. Nous chromatographions en BMH après avoir posé des taches de 30 à 100 μl . La phase aqueuse est concentrée à un faible volume à 50° C environ et posée entièrement sur la tache initiale d'un chromatogramme AHPy.

I) HYDROLYSE ACIDE MODEREE.

Un éluat préparatif contenant environ 100 μg de substance est évaporé à sec (à froid s'il s'agit d'une substance Bc !) dans un petit tube de verre et repris par 1 ml d'un mélange d'acétone et d'acide chlorhydrique 0,1 n (17 : 5). Nous chauffons en tube scellé pendant 30 minutes dans un bain-marie bouillant. Nous reprenons par

5 ml d'eau et extrayons par 3 fois 5 ml de chloroforme, évaporons à sec comme sous H) et chromatographions en BMH et en AHPy.

J) HYDROLYSE ACIDE ENERGIQUE.

Au lieu d'un éluat préparatif, nous utilisons aussi des solutions obtenues par hydrolyse enzymatique ou hydrolyse acide modérée. Après évaporation à sec, nous reprenons par 0,2 ml de méthanol, nous ajoutons 0,2 ml H_2SO_4 0,1 n et nous chauffons en tube scellé pendant 30 minutes dans un bain-marie bouillant. Nous procédons ensuite comme sous I).

K) REACTION DE RAYMOND.

Nous préparons les réactifs selon les indications de SCHINDLER et REICHSTEIN (47):

Solution I : Solution benzénique à 10 % de m-dinitrobenzène.

Solution II: 6 g NaOH + 25 ml d'eau + 45 ml de méthanol.

La substance à examiner est obtenue par élution préparative. L'éluat est fortement concentré, puis posé en une tache unique sur un morceau de papier chromatographique. Nous la recouvrons par une tache de solution I et chauffons à 60° C pendant 5 minutes. Le tout est alors surchargé d'une tache de solution II. La réaction est positive s'il apparaît une coloration rouge violacée. Cette réaction est spécifique des génines et hétérosides à noyau buténolide. La limite de sensibilité est de 5 ug.

L) FORMYLATION DE LA DIGITOXIGENINE.

Nous dissolvons 1 mg de digitoxigénine dans 0,035 ml d'acétone sec et nous ajoutons 0,09 ml d'acide formique à 98 %. Après un séjour de 30 minutes à température ordinaire, nous chassons sous vide la plus grande partie de l'acétone, reprenons le résidu par 1 ml d'eau et extrayons par du chloroforme. Au moyen d'un courant d'air froid, nous évaporons à sec la solution chloroformique et nous reprenons le résidu par 8 ml de méthanol-chloroforme (1 : 3). A 4 ml de cette solution nous ajoutons 4 ml d'une solution méthanolique saturée d'acétate de Pb et nous laissons séjourner à température ordinaire pendant 24 heures. La solution qui n'a pas reçu d'acétate de Pb est conservée à 4° C. les deux solutions sont analysées parallèlement par chromatographie BMH sur papier.

Chapitre quatrième

REPRODUCTIONS DES CHROMATOGRAMMES

=====

Légende des chromatogrammes reproduits :

Planche I DMH : T = lan A + lan B + lan C.

- 1 = Teinture méthanolique totale de feuilles.
- 2 = id. + acétate de Pb.
- 3 = Eluat initial de X₅Bc.
- 4 = Eluat initial de X₅Bc + acétate de Pb.
- 5 = Eluat initial de X₅Bc + NaHCO₃.
- 6 = Eluat initial de X₄Bc.
- 7 = Eluat initial de X₄Bc + acétate de Pb.
- 8 = Teinture méthanolique totale de graines.
- 9 = id. + acétate de Pb.
- T = Digitalinum verum.

Planche II. DMH : T = lan A + lan B + lan C.

- 10 = Teinture méthanolique totale de graines riches.
- 11 = Eluat initial de X₃Bc.
- 12 = Eluat initial de X₃Bc + acétate de Pb.
- 13 = 12 + déslan B.

BMH : 14 = oléandrine.

- 15 = oléandrine + acétate de Pb.
- 16 = oléandrine + NaHCO₃ (désacétyl-oléandrine).

Planche III. PH : T = lan B + déslan B.

- 17 = Eluat initial de X₅Bc + acétate de Pb.
- 18 = Eluat initial de X₅Bc + NaHCO₃.
- 19 = Eluat initial de X₄Bc + acétate de Pb.

T = Digitalinum verum.

- 20 = Eluat initial de X₃Bc + acétate de Pb.

T = déslan B + déslan C.

- 21 = 20 + déslan B

- 22 = gluco-gitaloxine + acétate de Pb.

T = déslan B + X₁B.

- 23 = 22 + déslan B

- 24 = 22 + X₁B.

Planche IV. BMH : T = ac-tri A + ac-tri B.

- 25 = Hydrolysats enzymatique de X₅Bc.
- 26 = Hydrolysats enzymatique de X₅Bc + acétate de Pb.
- T = gén A + gén B.
- 27 = Hydrolysats acide modéré de X₅Bc.
- 28 = Hydrolysats acide modéré de X₅Bc + acétate de Pb.
- 29 = Extrait total de vérodigène.
- 30 = Extrait total de vérodigène + acétate de Pb.
- T = tri A + tri B.

Planche V. BMH : T = gén A + gén B + gén C.

- 31 = Hydrolysats acide modéré de X₄Bc.
- 32 = Hydrolysats acide modéré de X₄Bc + acétate de Pb.
- 33 = Hydrolysats acide modéré de X₃Bc.
- 34 = Hydrolysats acide modéré de X₃Bc + acétate de Pb.
- 35 = Hydrolysats acide énergétique de X₃Bc (et X₁B).
- 36 = Hydrolysats acide énergétique de déslan B.
- 37 = monoanhydrogénine C (gén C + AT à chaud).
- 38 = Hydrolysats acide modéré de X₁B.
- 39 = Hydrolysats enzymatique de X₁B.
- T = gén A + gén B + gén C.

Planche VI. BMH prolongé (développement 15 heures).

- T = tri A + tri B.
- 40 = gitaloxine.
- 41 = gitaloxine + acétate de Pb.
- 42 = Hydrolysats enzymatique de X₃Bc.
- 43 = Hydrolysats enzymatique de X₃Bc + acétate de Pb.
- AHPy : T = Glucose + digilanidobiose + digitoxose.
- 44 = Hydrolysats enzymatique de X₅Bc.
- 45 = Hydrolysats enzymatique de X₃Bc.
- 46 = Hydrolysats acide modéré de X₃Bc.
- 47 = Hydrolysats acide modéré de X₁B.

DMH

PLANCHE I

T 1 2 3 4 5 6 7 T 8 9 T

X₁B et DESLAN B

X₂A

DIGITALINUM VERUM

X₂A

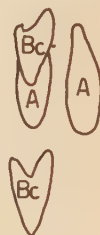
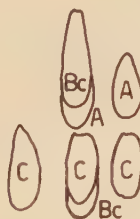


X₃Bc

DESLAN A

LAN C

X₄Bc

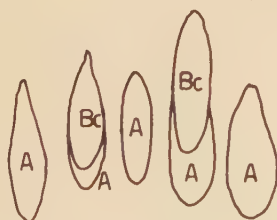


LAN B



X₅Bc

LAN A



DMH	PLANCHE II						BMH	
T	10	11	12	13	T	14	15	16
X ₁ B et DESLAN B X ₁ A						DESACETYL- OLEANDROSIDE		
DIGITALINUM VERUM X ₂ A								
X ₃ Bc DESLAN A								
LAN C X ₄ Bc						OLEANDROSIDE		
X ₄ A LAN B								
LAN A								

PH

PLANCHE III

T 17 18 19 T 20 T 21 22 T 23 24

LAN B



DESLAN B



X₁B
DESLAN G



DIGITALINUM VERUM



BMH

PLANCHE IV

T 25 26 T 27 28 29 30 T

ac-tri B

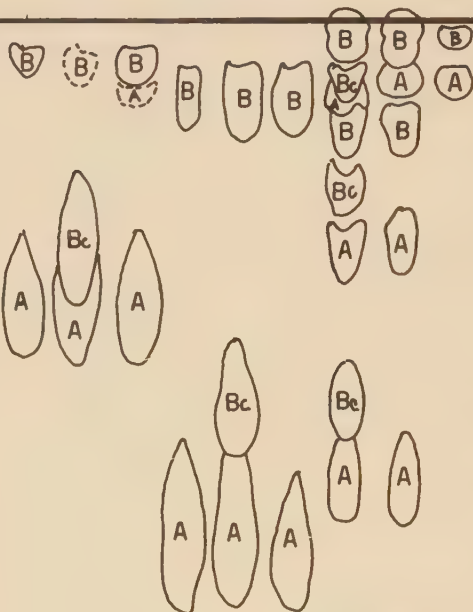
g  n B

X₁₂Bc

ac-tri A

X₉Bc

g  n A



tri B strosps  side

gitaloxine

tri A

g  n B

vérodoxine

odoroside H

gitaloxigénine

g  n A

BMH

PLANCHE V

T 31 32 33 34 35 36 37 38 39 T

gén C

(C) (C) (C) (C) (B) (B) tri B

gén B

(B) (B) (B) (B) (B) (B) (B) (B) (A) tri A
(A²)

X_gB_c

(B_c) (B_c) V₁ C
(A) (A) (A) (A) (A)
V₂ V₂

mono C

gén A

dia B

(AF) (AF)

BMH prolongé

PLANCHE VI

AHPy

T 40 41 42 43

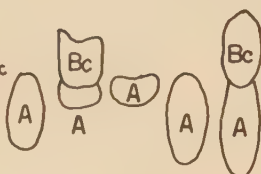
44 45 46 47 T

tri B



gitaloxine $\times_8 Bc$

tri A



glucose



digilani-dobiose



digitoxose



Chapitre cinquième

CONCLUSION

=====
 Nous avons étudié par les seuls moyens de la chromatographie sur papier trois néterosides cardénolides inconnus de Digitalis lanata Ehrh., ainsi que leurs produits de dégradation, obtenus par diverses hydrolyses. Voici les formules de constitution que nous attribuons à ces substances :

I. X_5Bc : $R' = 3$ digitoxoses (dont 1 acétylé + 1 glucose)

$R'' = -CHO$

II. $X_{12}Bc$: $R' = 3$ digitoxoses (dont 1 acétylé)

$R'' = -CHO$

III. X_9Bc : $R' = H$

$R'' = -CHO$

IV. X_4Bc : $R' =$ digitalose-glucose

$R'' = -CHO$

V. DV : $R' =$ digitalose-glucose

$R'' = H$

VI. X_3Bc : $R' = 3$ digitoxoses + 1 glucose

$R'' = -CHO$

VII. $X_{11}B$: $R' = 3$ digitoxoses + 1 glucose

$R'' = H$

VIII. X_8Bc : $R' = 3$ digitoxoses

$R'' = -CHO$

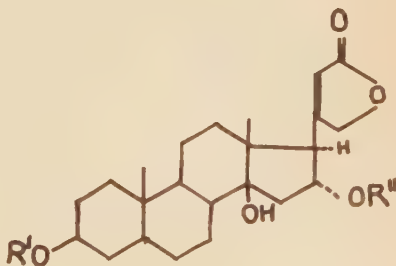
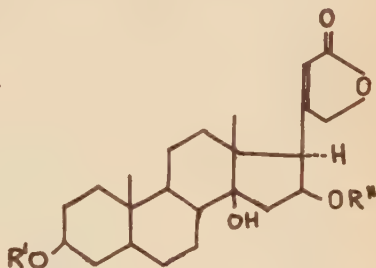
IX. tri B': $R' = 3$ digitoxoses

$R'' = -CHO$

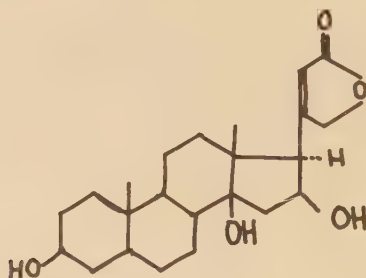
X. X_9Bc : $R' = H$

$R'' = -CHO$

XI. gén B': $R' = R'' = H$

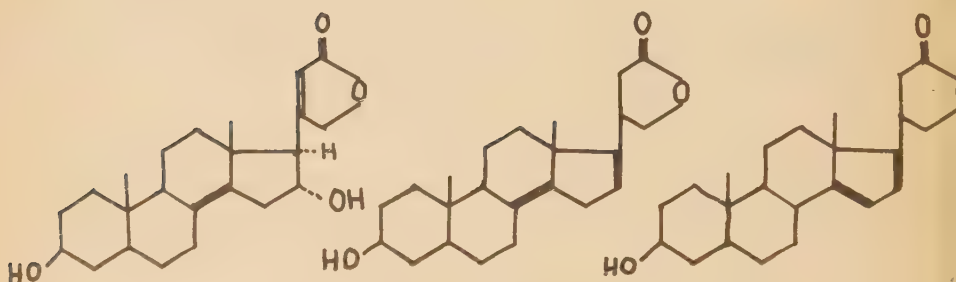


Lors de la dégradation par traitement acide énergique des génines B et B' et de leurs hétérosides, nous admettons les réactions suivantes :



génine B

H^+ = gitoxigénine



XII:

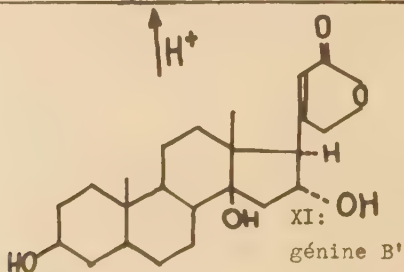
"V₁" (8-14-mono-anhydrogén B')?

XIII:

"V₂" (8-14, 16-17-dianhydrogén B)?

XIV:

14-15,16-17-dianhydrogén B



génine B'

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) H. BALJET.- Schweiz. Ap. Ztg. 56, 84 (1918).
- (2) D.H.R. BARTON.- Experientia 6, 316 (1950).
- (3) P. BELLET.- Ann. pharm. franç. 8, 47 (1950).
- (4) B.T. BROWN, E.E. SHEPHEARD, et S.E. WRIGHT.- J. Pharmacol. and exp. Therap. 118, 39 (1956).
- (5) I.E. BUSH et D.A.H. TAYLOR.- Biochem. J. 52, 643 (1952)
- (6) H.M.E. CARDWELL et S. SMITH.- J. Chem. Soc. 1954, 2012.
- (7) E. CHARGAFF, G. LEVINE et G. GREEN.- J. Biol. Chem. 175, 67 (1948).
- (8) R. CONSDEN, A.H. GORDON et A.J.P. MARTIN.- Biochem. J. 38, 244 (1944).
- (9) R.M. DASH et M.L. FRITH.- J. Pharm. Pharmacol. 6, 471 (1954).
- (10) DAY.- Voir A. TISELIUS.- Endeavour 11, 5 (1952).
- (11) R. DEQUEKER et F. LEMLI.- Planta Medica 4, 162 (1956).
- (12) DHERE.- Voir ZECHMEISTER et CHOLNOKY (64).
- (13) L. FAUCONNET et R. FAZAN.- Bull. Soc. Vaud. Sc. Nat. 66, 307 (1956).
- (14) L. FAUCONNET et R. FAZAN.- Pharm. Acta Helv. 32, 361 (1957).
- (15) L. FAUCONNET et K. KREIS.- Bull. Soc. Vaud. Sc. Nat. 65, 347 (1952).
- (16) L. FAUCONNET et K. KREIS.- Pharm. Acta Helv. 32, 253 (1957).
- (17) L. FAUCONNET et D. KUTTER.- Actes SHSN. 1956, 212.
- (18) R. FAZAN.- Thèse de doctorat ès sciences. Lausanne 1955. Travail inédit.
- (19) GOPPELSRÖDER.- Voir A. GRÜNE.- Arzneimittelforsch. 4, 347 (1954).
- (20) E. HAACK, F. KAISER et H. SPINGLER.- Naturwissensch. 42, 441 (1955).
- (21) E. HAACK, F. KAISER et H. SPINGLER.- Ber. 89, 1353 (1956).
- (22) E. HAACK, F. KAISER, M. GUBE et H. SPINGLER.- Naturwissensch. 43 301, (1956).
- (23) E. HAACK, F. KAISER, M. GUBE et H. SPINGLER.- Arzneimittelforsch. 6, 176 (1956).
- (24) A. HEUSNER.- Angew. Chemie 63, 59 (1951).
- (25) M. ISHIDATE, M. OKADA et Y. SASAKAWA.- Bull. Pharm. Soc. Jap. 1 186, (1953).
- (26) F. JAMINET.- J. Pharm. Belg. 1951, 90.
- (27) K.B. JENSEN.- Act. Pharmacol. Tox. 2, 99 (1953).
- (28) K.B. JENSEN.- Act. Pharmacol. Tox. 12, 11 (1956).

- (29) K.B. JENSEN.- Act. Pharmacol. Tox. 12, 20 (1956).
- (30) A. JERMYN et F. A. ISHERWOOD.- Biochem. J. 44, 403 (1949).
- (31) F. KAISER.- Ber. 88, 556 (1955).
- (32) F. KAISER, E. HAACK et H. SPINGLER.- A. 603, 75 (1957).
- (33) D.L. KEDDE. Thèse de doctorat en pharmacie. Leiden 1946.
- (34) M. KIMURA.- J. Pharm. Soc. Jap. 71, 991 (1951).
- (35) K. KREIS.- Thèse de doctorat en pharmacie. Lausanne 1953.
- (36) R. KUHN, A. WINTERSTEIN et E. LEDERER.- Hoppe-Seyler Z. 197, 141, (1931).
- (37) E. LEDERER.- J. Chim. Phys. 51, D 119 (1954).
- (38) J.P. MARTIN et R.M.L. SYNGE.- Biochem. J. 35, 1358 (1941).
- (39) J.A. MOORE.- Helv. chem. Acta 37, 659 (1954).
- (40) J.E. MURPHY. J. Am. Pharm. Ass. 43, 659 (1954).
- (41) M. POTTERAT.- Trav.chim.alim. et Hyg. 47, 66 (1956).
- (42) W.D. RAYMOND.- Analyst 63, 478 (1938).
- (43) J.P. ROSSELET et T. REICHSTEIN.- Helv. Chim. Acta 36, 787 (1953).
- (44) F. RUNGE.- Des Bildungstrieb des Stoffe veranschaulicht in selbstständig gewachsenen Bildern. Oranienburg 1855.
- (45) L.RUTTER.- Analyst 75, 37 (1950).
- (46) D. SATOH, H. ISHII, Y. OYAMA, T. WADA et T. OKUMURA.- Pharm. Bull. Jap. 4, 284 (1956).
- (47) O. SCHINDLER et T. REICHSTEIN.- Helv. Chim. Acta 34, 108 (1951).
- (48) SCHOENBEIN. Voir KUNZ-KRAUSE. Handbuch der prakt. und wissensch. Pharmazie.
- (49) H. SILBERMAN et R. H. THORP.- J. Pharm. Pharmacol. 6, 546 (1954).
- (50) S. SMITH.- J. Chem. Soc. 1936, 354.
- (51) A. STOLL.- The cardiac Glucosides. Pharm. Press, Londres 1937.
- (52) A.B. SVENDSEN et K.B. JENSEN.- Pharm. Acta. Helv. 25, 241 (1950).
- (53) Ch. TAMM.- Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe 13, 137 (1956); 14, 71 (1957).
- (54) R. TSCHESCHE, G. GRIMMER et F. SEEHOFER.- Ber. 86, 1235 (1953).
- (55) R. TSCHESCHE, G. GRIMMER et F. NEUWALD.- Ber. 85, 1103 (1952).
- (56) R. TSCHESCHE, G. GRIMMER.- Ber 88, 1569 (1955).
- (57) R. TSCHESCHE et G. SNATZKE.- Ber. 88, 511 (1955).
- (58) M. TSWETT.- Voir G. HESSE et H. WEIL. Michael Tswett's erste chromatographische Schrift. Editins Woelm, Eschwege 1954.

- (59) J. TUZSON et G. VASTAGH.- Arch. Pharm. 26, 203 (1956).
- (60) E. WEGNER.- Arzneimittelforsch. 2, 382 (1952).
- (61) M. WICHTL.- Naturwissensch. 43, 158 (1956).
- (62) R. WILLIAMS et M. KIRBY.- Science 107, 481 (1948).
- (63) K. YOSHIDA, D. SATOH, H. ISHII et Y. NISHIMURA.- Pharm. Bull. Jap. 1, 305 (1953).
- (64) L. ZEICHMEISTER et L. CHOLNOKY.- Die papierchromatographische Adsorptionsanalyse. Editions Springer. Vienne 1937.

TABLE DES MATIERES

I.	I N T R O D U C T I O N	1
A)	GENERALITES SUR LA CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER	1
1.	Historique	1
2.	Théorie	2
3.	Techniques	3
4.	Révélation	4
B)	APPLICATIONS AUX CARDIOTONIQUES DIGITALIQUES	4
C)	CHIMIE DES CARDIOTONIQUES DIGITALIQUES	5
D)	BUT DU PRESENT TRAVAIL	8
II.	P A R T I E T H E O R I Q U E	9
A)	TRAVAUX PRECEDENTS	9
B)	RECHERCHES PERSONNELLES	10
1.	La substance X ₅ Bc	10
a)	Généralités	10
b)	La transformation de X ₅ Bc en lanatoside B	12
c)	Localisation des fonctions ester	12
d)	Nature de l'ester en 16	14
e)	Mécanisme de l'action de l'acétate de Pb	15
f)	Le "parallélisme" A-Bc	17
2.	La Substance X ₄ Bc	18
a)	Généralités	18
b)	La transformation de X ₄ Bc en digitalinum verum	18
c)	Localisation du groupe ester	19
d)	Contenu hétérosidique des graines de Digitalis lanata Ehrh.	20
3.	La substance X ₃ Bc	20
a)	Travaux précédents	20
b)	Généralités	21
c)	La transformation de X ₃ Bc en X ₁ B	23
d)	Localisation du groupe ester	23
e)	X ₃ Bc et gluco-gitaloxine	25
4.	La substance X ₁ B	25
a)	Généralités	25
b)	Hydrolyse enzymatique	26

c) Hydrolyse acide modérée	26
d) Hydrolyse acide énergique	27
e) La substance V ₁	28
f) La substance V ₂	28
g) Interprétations et discussion	29
h) Conclusion	31

III. P A R T I E E X P E R I M E N T A L E

A) PAPIER CHROMATOGRAPHIQUE	33
B) REACTIFS	33
C) TECHNIQUE CHROMATOGRAPHIQUE SUR PAPIER	33
1. Systèmes solvants DMH, BMH et AHPy	33
2. Système solvant PH	33
D) REVELATEURS	34
E) ELUTION PREPARATIVE	34
F) HYDROLYSE PAR L'ACETATE DE PLOMB	35
G) HYDROLYSE PAR LE BICARBONATE DE SODIUM	35
H) HYDROLYSE ENZYMATIQUE	35
I) HYDROLYSE ACIDE MODEREE	35
J) HYDROLYSE ACIDE ENERGIQUE	36
K) REACTION DE RAYMOND	36
L) FORMYLATION DE LA DIGITOXIGENINE	36

IV. R E P R O D U C T I O N S D E S C H R O M A T O G R A M M E S

37

V. C O N C L U S I O N

45

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	47
-----------------------------	----

